

УДК: 57.043:577.322.4

Влияние низких температур на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы человека

Т.С.Дюбко¹, А.Б.Малышев², Н.Н.Чуб¹, В.Л.Родионова¹, М.И.Крамар¹, А.А.Гапон¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (Харьков, Украина)

²НИИ биологии Харьковского национального университета имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

В работе с использованием методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле исследовано влияние условий низкотемпературного хранения на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы человека. Показано, что хранение при температуре -196°C оказывает минимальное негативное воздействие на состав и конформационное состояние белков спермальной плазмы по сравнению с ее содержанием при -12°C .

Ключевые слова: спермальная плазма человека, белки, конформационное состояние, низкие температуры, флуоресценция, синхронные спектры.

Вплив низьких температур на склад та конформаційний стан білків спермальної плазми людини

Т.С.Дюбко, А.Б.Малишев, Н.Н.Чуб, В.Л.Родионова, М.І.Крамар, А.А.Гапон

В роботі з використанням методів флуоресцентної спектроскопії й електрофорезу в поліакриламідному гелі досліджено вплив умов низькотемпературного зберігання на склад і конформаційний стан білків спермальної плазми людини. Показано, що зберігання при температурі -196°C спричиняє мінімальний негативний вплив на білковий спектр і конформацію білків спермальної плазми у порівнянні з її утриманням при -12°C .

Ключові слова: спермальна плазма людини, білки, конформаційний стан, низькі температури, флуоресценція, синхронні спектри.

The effect of low temperature on the composition and conformational state of proteins of human spermal plasma

T.S.Dyubko, A.B.Malyshev, N.N.Tchoob, V.L.Rodionova, M.I.Kramar, A.A.Gapon

In the work using fluorescent spectroscopy and electrophoresis in polyacrylamide gel the effect of low-temperature storage on the composition and conformational state of proteins of human spermal plasma has been investigated. It has been shown that storage at -196°C has minimal negative effect on the protein spectrum and conformation of spermal plasma proteins in comparison with storage at -12°C .

Key words: human spermal plasma, proteins, conformational state, low temperatures, fluorescence, synchronous spectra.

Введение

В литературе достаточно широко представлены работы, посвященные изучению влияния замораживания-отогрева на изолированные белки. Среди причин, вызывающих повреждение белков в процессе замораживания-отогрева, могут быть названы: дегидратация клетки (Гулевский и др., 1982), гиперконцентрация солей (Иванов и др., 1977; Морозова и др., 1982; Науменко, Розанова, 1984), вне- и внутриклеточная кристаллизация (Пушкар, Белоус, 1981). Перечисленные факторы в значительной степени влияют и на гетерогенные белковые смеси, находящиеся в составе природных жидкостей. Однако свойства и реакция на факторы криоконсервирования изолированных белков могут значительно отличаться от их свойств в комплексе с другими белками и низкомолекулярными веществами (аминокислотами, пептидами, гормонами). Тем не менее, именно оценка поведения гетерогенной белковой системы в биологических жидкостях как единого целого часто необходима на практике при определении степени её повреждения при действии различных физико-химических факторов, в том числе низких температур. Имеется незначительное число работ, посвященных изучению воздействия низких температур на структурное состояние белков, находящихся в составе плазмы крови (Мошко, 2003), фолликулярной жидкости (Яковлева, 2007).

Сперма – биологическая жидкость организма человека, в норме содержащая различные клетки (сперматозоиды, лейкоциты и др.) и спермальную плазму (СП). СП богата белками, содержание

которых у разных видов животных находится в пределах от 1 до 10%, содержит аминокислоты, углеводы, особенно фруктозу. В ней находится значительное количество солей: карбонатов, цитратов, лактатов, фосфатов, поддерживающих pH спермы. СП играет значительную роль в решении проблем коррекции патологии спермиев (Cross, 1996). Было показано, что подвижность спермиев человека при астенозооспермии может быть увеличена при инкубации их с донорской СП (Дунаевская, 2000) и статистически достоверно выше после размораживания, если в среду консервирования добавляли 35–50 % СП (Check et al., 1993; Ben et al., 1997; Дунаевская, 2000).

Целью настоящей работы является исследование влияния низких и сверхнизких температур на состав и конформационное состояние белков СП человека с помощью методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ).

Объекты и методы исследования

Материалом исследования служили образцы спермы, полученные у 7 доноров с нормозооспермией. Оценку качества спермы производили с помощью стандартных методов, согласно рекомендациям ВОЗ (World Health Organization, 1997). В экспериментах были использованы эякуляты с концентрацией спермиев $80 \pm 7,9$ млн. в 1 мл и содержанием активно-подвижных и подвижных спермиев – $26 \pm 2,1$ % и $37 \pm 3,2$ % соответственно. После анализа спермокинезисграммы эякулят центрифугировали при 3000 об/мин и отбирали СП в 1 мл полиэтиленовые ампулы. Одну часть проб СП замораживали со скоростью $300\text{--}400^\circ\text{C}/\text{мин}$ путем погружения в жидкий азот (-196°C), вторую – охлаждали со скоростью $2\text{--}3^\circ\text{C}/\text{мин}$ в морозильной камере холодильника «Минск» и хранили при -12°C .

Отогревали СП на водяной бане при 37°C . Для анализа белкового состава СП подвергали электрофорезу в пластинах с 7,5% ПААГ, pH 8,9, по стандартной методике (Остерман, 1984). После проведения электрофореза гели окрашивали кумасси G-250. Высушенные гели сканировали и анализировали распределение плотности окраски с помощью программы «Digitize». Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian) с автоматической коррекцией спектров. Ширины входной и выходной щелей монохроматоров составляли 5 нм. Образцы СП разводили физиологическим раствором так, чтобы их оптическая плотность на длине волны возбуждения флуоресценции не превышала 0,1 D. Все спектральные измерения выполнялись при 20°C в стандартных кварцевых кюветах (13 см). Спектры собственной флуоресценции (СФ) белков СП возбуждали при длинах волн 280 нм (общая флуоресценция тирозиновых и триптофановых остатков), 296 нм (триптофановая флуоресценция) и 340 нм (продукты деградации белков). Спектры возбуждения (СВ) образцов регистрировали в максимуме их спектров флуоресценции. Синхронные спектры флуоресценции (ССФ) получали, сканируя монохроматоры возбуждения и флуоресценции от 200 до 500 нм, при их сдвиге $\Delta\lambda$ от 10 до 200 нм, с шагом 10 нм. Изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции (ИПССФ), представляющие собой трехмерный вариант ССФ, строили, используя программное обеспечение Cary Eclipse. Обработку спектров производили в программе Microcal Origin 6.0.

Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента-Фишера с использованием программного пакета «Statgraf».

Результаты и обсуждение

Как видно на рис. 1, СФ белков СП характеризуются значениями $\lambda_{\text{макс}} = 344 \pm 2,5$ нм, что свидетельствует о существенном вкладе в спектры триптофановых остатков (Добрецов и др., 1981; Черницкий, 1972), доступных водному окружению (Burstein et al., 1973; Бурштейн, 1977; Драган, Храпунов, 1989). О вкладе триптофанилов в спектры флуоресценции белков свидетельствуют также спектры возбуждения образцов СП, в которых выделяется характерный для триптофана максимум при 290–292 нм (рис. 1). В то же время, присутствие интенсивного максимума при 291 ± 1 нм, наблюдающегося в спектрах возбуждения 20-кратно разведенных образцов СП и отсутствующий в 200-кратно разведенных образцах, может быть связано с протеканием в данной гетерогенной системе процессов индуктивно-резонансного переноса энергии электронного возбуждения на триптофан. При этом донорами энергии могут быть как тирозиновые остатки белков, так и свободные аминокислоты при их нековалентном связывании с белками СП. Присутствие тирозиновых остатков проявляется в спектрах флуоресценции в виде плеча при 315–319 нм.

Так как белки СП представляют собой гетерогенную смесь белковых молекул, в состав которой входят альбумин, иммуноглобулины, орозомиоид, бета-1-трансферрин и др., параметры их СФ являются некоторой интегральной характеристикой, которая отражает общую реакцию белков СП на низкотемпературное воздействие.

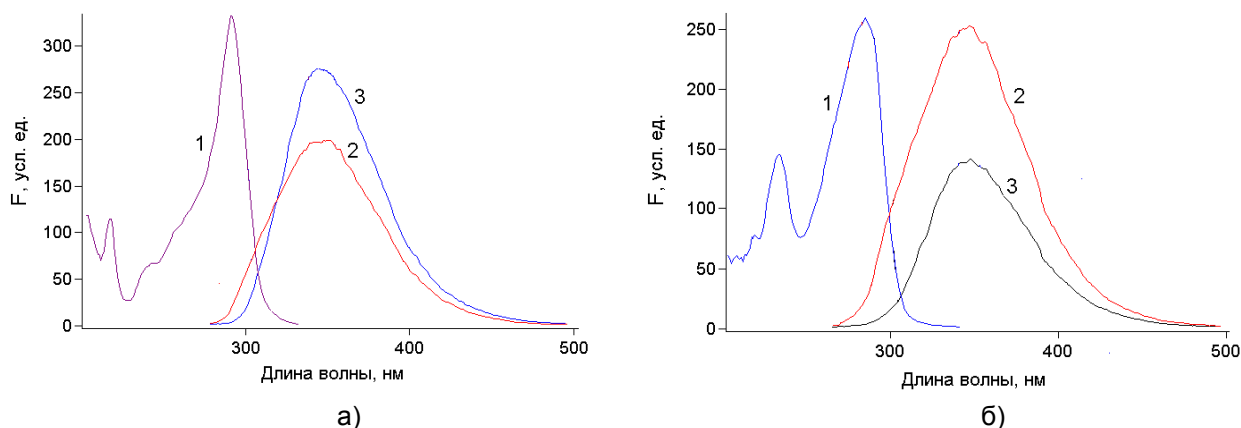


Рис. 1. Спектры возбуждения (1) и флуоресценции (2, 3) белков спермальной плазмы: 2 – $\lambda_{\text{возб}}=280$ нм; 3 – $\lambda_{\text{возб}}=296$ нм; а) разведение в 20 раз; б) разведение в 200 раз (F – интенсивность флуоресценции)

Дополнительной оценкой конформационного состояния белков СП являются ССФ, чувствительные к изменению состояния микроокружения триптофановых и тирозиновых остатков в белках (Векшин, 1996). По сути, ССФ представляют собой срез спектров возбуждения и флуоресценции, в которых, при варьировании величины смещения ($\Delta\lambda$) монохроматоров возбуждения и флуоресценции, появляется возможность выделения отдельных компонент, огибающих набор кривых ССФ, полученных при различных фиксированных значениях $\Delta\lambda$, которая совпадает со спектром возбуждения образца (рис. 2).

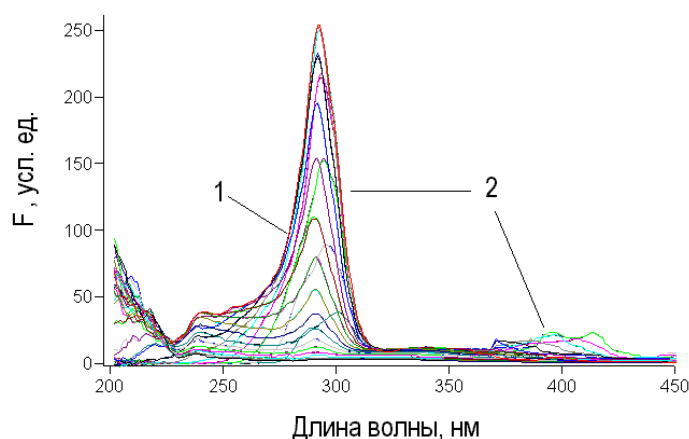


Рис. 2. Спектр возбуждения (1) и синхронные спектры флуоресценции (2) белков спермальной плазмы

Как видно на рис. 2, в нативной СП разделяются компоненты ССФ с максимумами при 286–288, 300 нм ($\Delta\lambda=10$ нм) и 294 нм ($\Delta\lambda=30$ нм), относящиеся к тирозиновым и триптофановым остаткам белков, а также при 215 и 240 нм ($\Delta\lambda=130$ нм), представленные аминокислотными остатками белков и свободными аминокислотами.

Хранение образцов при -12°C , наряду с общим снижением интенсивности флуоресценции, приводило к длинноволновому смещению СФ белков СП на 6–8 нм (к 352–354 нм) с одновременным снижением интенсивности триптофановой флуоресценции белков ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) (рис. 3). В СВ и ССФ появляется пик с максимумом при 340–345 нм, возбуждение флуоресценции которого приводит к появлению эмиссии при 430–440 нм (рис. 3). Подобные спектральные изменения связаны с денатурацией части белков СП и повышением доступности для воды триптофановых остатков.

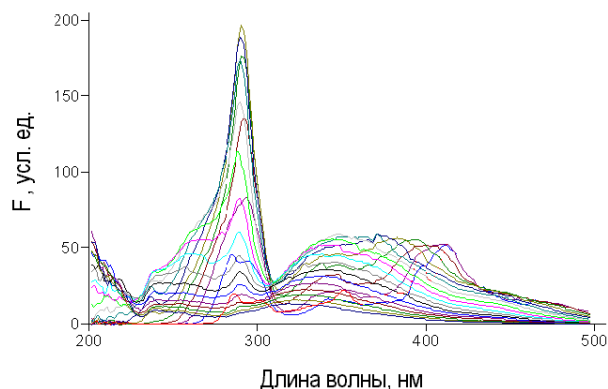


Рис. 3. Влияние хранения при -12°C на синхронные спектры флуоресценции белков спермальной плазмы

Анализ спектральных характеристик образцов СП, подвергнутых хранению при -196°C , показал, что имеет место снижение как общей флуоресценции белков, так и разницы между суммарной ($\lambda_{\text{возб}}=280$ нм) и триптофановой ($\lambda_{\text{возб}}=296$ нм) флуоресценцией, однако длинноволновый сдвиг СФ составлял 1–5 нм. Криоконсервирование вызывает относительно меньшее снижение вклада тирозиновой флуоресценции в суммарные СФ и не приводит к появлению дополнительных пиков в СВ и ССФ.

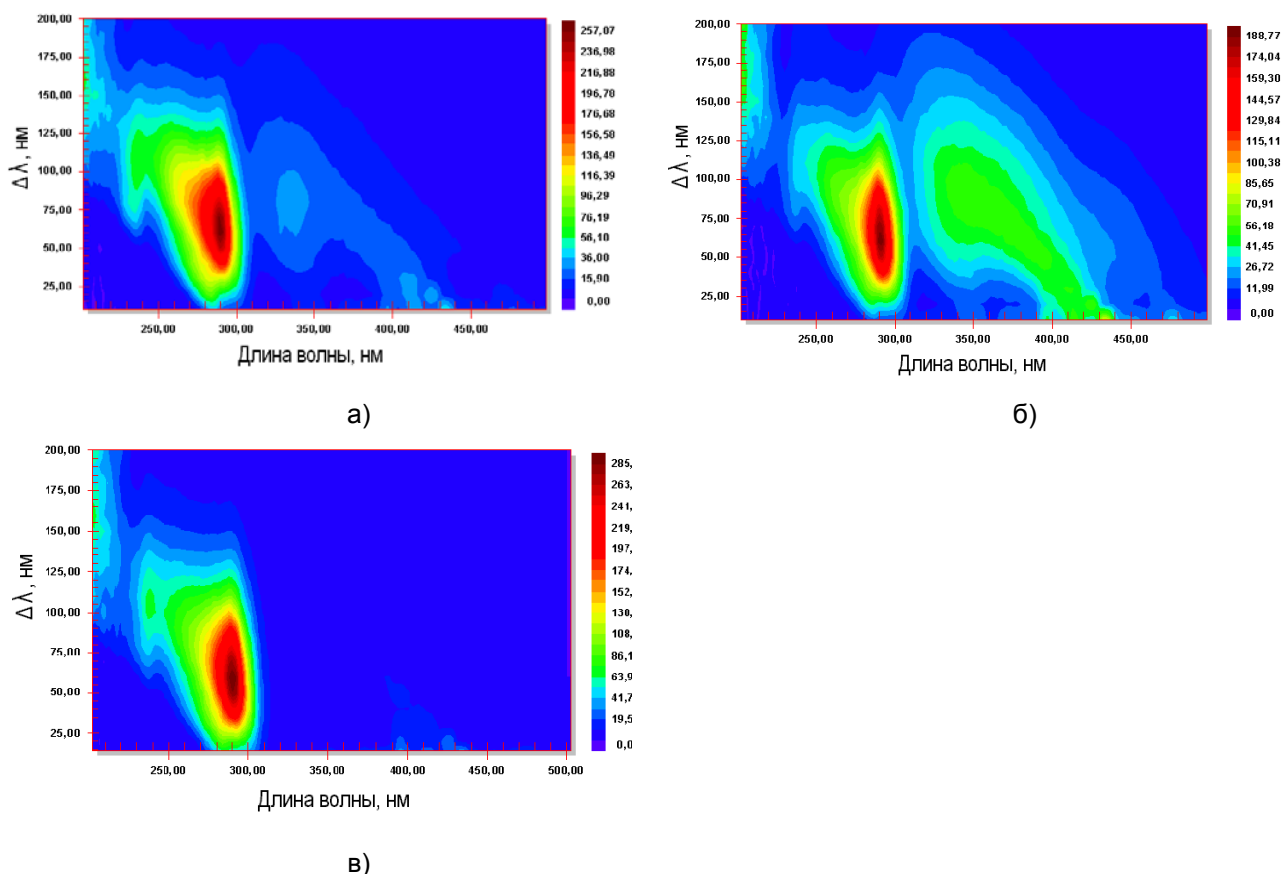


Рис. 4. Влияние температуры хранения на изопотенциальные синхронные спектры флуоресценции белков спермальной плазмы: а) нативная сперма; б) хранение при -12°C ; в) хранение при -196°C

Трехмерный вариант ССФ, называемый изопотенциальными спектрами флуоресценции (ИПССФ), представляет собой соединенные огибающими линии ССФ с равной интенсивностью и

является наиболее наглядной спектральной характеристикой белков СП (рис. 4, а). ИПССФ белков СП, полученные при сканировании монохроматоров возбуждения и флуоресценции от 10 до 200 нм с шагом 10 нм, имеют вид локализуемого в области 225–325 нм пятна неправильной формы с центром при 290–292 нм. После действия низких температур на СП наблюдали незначительные изменения в ИПССФ при хранении -196°C (рис. 4, в), в то время как содержание СП при -12°C характеризуется появлением эмиссии в длинноволновой области с максимумом при 345–350 нм и 380–450 нм (рис. 4, б). Приведенное описание в целом характеризует ИПССФ белков СП, однако, могут быть вариации формы изображений, что связано с индивидуальными особенностями спермы доноров.

По-видимому, содержание в СП фосфолипидсодержащих протеинов и глюкозаминогликанов способствуют формированию мелкокристаллической структуры льда, что снижает повреждение макромолекул. По сути, СП в данном случае выступает как природный криопротектор (Ben et al., 1997). Кроме того, в условиях глубокого замораживания снижено влияние факторов, способствующих окислительной деградации белков.

Анализ данных гель-электрофореза показал, что хранение при -12°C приводит к уменьшению содержания белков в СП, что может быть связано с необратимыми конформационными изменениями и окислительной деградацией части белков (рис. 5). Наиболее повреждаются при этом фракции иммуноглобулинов, а также, частично, альбумина и некоторых низкомолекулярных белков (рис. 5, б). Хранение при температуре жидкого азота меньше влияет на белковый спектр СП (рис. 5, в), однако, при этом также наблюдается снижение общего количества белка в образцах, что может быть связано с частичной агрегацией и выпадением в осадок наиболее криолабильных компонент.

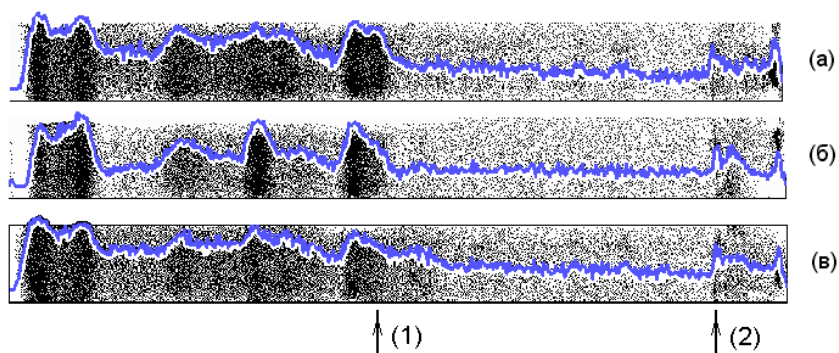


Рис. 5. Гель-электрофореграммы и денситограммы (наложены) спермальной плазмы: (а) – нативная СП; (б) – хранение при -12°C ; (в) – при -196°C в течение 1 месяца. Стрелками указано положение фракций альбумина (1) и иммуноглобулинов (2)

Таким образом, проведенные исследования показали, что белки СП проявляют высокую чувствительность к условиям хранения. При этом степень сохранности образцов определяется не только температурой хранения, но и зависит от исходного состояния и соотношения различных типов белков в образцах. Следует отметить, что расширенное исследование экскреторной функции мужских репродуктивных органов может быть использовано не только для выявления причин бесплодия, но представляет возможным выяснение эндокринных и белково-ферментативных отклонений.

Выводы

1. Хранение спермальной плазмы человека при умеренно низкой температуре (-12°C) приводит к деградации входящих в ее состав белков.
2. Замораживание и хранение при температуре жидкого азота (-196°C) оказывает минимальное повреждающее воздействие на белки и является предпочтительным для длительного хранения спермальной плазмы человека.
3. Использование методов флуоресцентной спектроскопии и электрофореза для оценки состояния белков в спермальной плазме человека может быть рекомендовано в качестве теста для индивидуальной оценки спермы человека.

Список литературы

Бурштейн Э.А. Собственная люминесценция белков. (Природа и применение) // Биофизика. – М.: ВИНТИ АН СССР, 1977. – Т.7. – 189с.

- Векшин Н.Л. Разделение тирозиновой и триптофановой компонент флуоресценции методом синхронного сканирования // Биофизика. – 1996. – Т.41, №6. – С. 1176–1179.
- Гулевский А.К., Сахаров Б.В., Волков В.Я. Низкотемпературное нарушение проницаемости плазматических мембран, связанное с дегидратацией // Докл. АН СССР. – 1982. – Т.263, №5. – С. 1250–1254.
- Добрецов Г.Е., Спирин М.М., Карякин А.В и др. Исследование с помощью индуктивно-резонансного переноса энергии пространственных взаимоотношений между белками и липидами в мембранах микросом печени // Биохимия. – 1981. – Т.46, №3. – С. 504–511.
- Драган А.И., Храпунов С.Н. Адсорбционные и люминесцентные исследования межмолекулярных взаимодействий тирозинового хромофора. I. Анализ спектров поглощения и флуоресценции // Биофизика. – 1989. – Т.34, №2. – С. 187–193.
- Дунаевская А.В. Влияние спермальной плазмы, кордовой сыворотки и сыворотки крови человека в среде криоконсервации на сохранность криоконсервированных спермиев // Пробл. криобиологии. – 2000. – №3. – С. 44–49.
- Иванов Л.В., Моисеев В.А., Гаврилова И.И. Исследование влияния гиперконцентрации солей на структуру Нб методом спин-меток // III Всес. конф. по спектроскопии биополимеров: Тез. докл. – Харьков, 1977. – С. 82–83.
- Морозова Т.Ф., Грек А.М., Коптелов В.А. и др. Изменения спектральных свойств бычьего сывороточного альбумина в концентрированных растворах хлористого натрия // Криобиология и криомедицина. – 1982. – №10. – С. 22–29.
- Мошко Ю.О. Кріоконсервування сироватки кордової крові, визначення її біологічної активності та клінічної ефективності в терапії хронічних сальпінгофоритів. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Х., 2003. – 19с.
- Науменко Е.И., Розанова Е.Д. Изучение механизмов и криповреждения изолированной цитохромоксидазы // II Всес. конф. «Криобиология и криомедицина». – Харьков, 1984. – Т.1. – С.61.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. – М.: Наука, 1984. – 288с.
- Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Актуальные проблемы криобиологии. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608с.
- Черницкий Е.А. Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке. – Минск: Наука и техника, 1972. – 134с.
- Яковлева Е.А. Вплив низьких температур на деякі біофізичні та біохімічні характеристики фолікулярної рідини яєчника людини. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Х., 2007. – 20с.
- Ben W.X., Fu M.T., Mao L.K. et al. Effects of various concentrations of native seminal plasma in cryoprotectant on viability of human sperm // Arch. Androl. – 1997. – Vol.39. – P. 211–216.
- Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules // Photochem. and Photobiol. – 1973. – Vol.18, №1. – P. 263–279.
- Check J., Check M.L., Bollendorf A. et al. Failure of the addition of fresh seminal plasma to cryopreserved-thawed sperm to improve semen parameters // Arch. Androl. – 1993. – Vol.31. – P. 121–125.
- Cross N.L. Human seminal plasma prevents sperm from becoming acrosomally responsive to the agonist, progesterone: cholesterol is the major inhibitor // Biol. Reprod. – 1996. – Vol.54. – P. 138–145.
- World Health Organization Laboratory manual for examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. – Cambridge: The Press Syndicate of the University of Cambridge, 1997. – 22p.

Представлено: Л.Д.Паценкер / Presented by: L.D.Patsenker

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 17.04.2009

© Т.С.Дюбко, А.Б.Малишев, Н.Н.Чуб, В.Л.Родіонова, М.Й.Крамар, А.А.Гапон, 2009

© T.S.Dyubko, A.B.Malyshev, N.N.Tchoob, V.L.Rodionova, M.I.Kramar, A.A.Gapon, 2009